292-30011B
Feb. 2007

SHIMADZU BIOTECH

# Transdirect *insect cell*

# 取 扱 説 明 書

この文書をよく読んで正しくご使用ください。
いつでも使用できるように大切に保管してください。

島津製作所

分 析 計 測 事 業 部

# はじめに

## ■保証について

このたびは本製品をご購入いただきましてありがとうございます。
本製品に対し、下記の保証をしております。保証内容をよくお読みになり本製品をご使用ください。

- **保証期間**　有効期限は、試薬キット外袋に記載しています。有効期限以内にご使用ください。
- **保証内容**　取扱説明書に記載した品質を保証します。ただしお客様所有の遺伝子からタンパク質が合成し得ることを保証するものではありません。保証期間内に品質に異常があった場合は、製品の代替を無償でいたします。
- **保証できない事項**　保証期間内に品質に異常があった場合でも、下記に該当する場合は保証の対象から除外させていただきます。
  (1) 誤ってお取り扱いになられた場合
  (2) 保存方法が不適切な場合
  (3) 異常の原因が本製品以外の理由による場合

**注記**　**有効期限を過ぎたものをご使用になった場合、本来の合成能が得られない可能性があります。ご注意ください。**

## ■使用目的について

- 本製品は研究用試薬です。本製品の研究目的以外の使用にあたっては、別途ライセンス契約を結ぶ必要があります。
- 本製品により合成したタンパク質を商品化する場合は、別途ライセンス契約を結ぶ必要があります。

## ■おことわり

- 本書の著作権は、株式会社　島津製作所 が所有しています。当社の許可なく内容の一部または全部を転載・複製することはおやめください。
- 本書の内容は改良のため、将来予告なく変更することがあります。
- 本書の内容は作成にあたり万全を期しておりますが、万一誤りや記載もれなどが発見されても、ただちに修正できないことがあります。

© 2004-2007 Shimadzu Corporation. All rights reserved.

## ■警告表示について

この取扱説明書では、注意事項を危険や損害の大きさに応じて、次の表示で区分しています。

| | |
|---|---|
| ⚠ 警告 | その事象を避けなければ、死亡または重傷に至る可能性のある場合に用いています。 |
| ⚠ 注意 | その事象を避けなければ、軽傷または中程度の傷害を負う可能性のある場合、および物的損害の可能性のある場合に用いています。 |
| 注記 | 試薬を正しくご使用していただくための情報を記載しています。 |

※ 軽傷または中程度の傷害とは、治療に入院や長期の通院を要さない場合を示しています。
※ 物的損害とは、家屋・家財など製品以外の周辺の物におよぼす拡大損害を示しています。

## ■安全にお使いいただくために

本製品を安全にお使いいただくために、次のことをお守りください。

| | |
|---|---|
| ⚠ 警告 | 一般に合成されたタンパク質やペプチドが予期できない毒性や病原性を有するおそれがあります。実験操作を行う場合は、手袋、ゴーグル、マスクおよび安全キャビネットなどの安全器具や装置を正しく使用してください。生成物を廃棄する場合は、オートクレーブなどの不活性化処理を確実に行ってください。 |

| | |
|---|---|
| ⚠ 警告 | 万一試薬や反応液、生成物などが目や皮膚に付着した場合、飲み込んだり吸い込んだりした場合は、すみやかに医師に相談し、その指示に従ってください。 |

| | |
|---|---|
| ⚠ 注意 | 実験室での一般的注意事項を厳守し、安全に留意してください。 |

| | |
|---|---|
| ⚠ 注意 | ラジオアイソトープ（RI）を用いた実験は、専用の RI 実験施設内で行う必要があります。RI を取扱う場合には、国や自治体、所属する施設などの定める法律、省令および規則に従ってください。 |

・ 未使用や使用残りの試薬を取扱う際には、MSDS を参考にしてください。

# 目　次


**はじめに** ..... ii

**製品内容** ..... 1

■概要 ..... 1

■構成 ..... 1

Insect Cell Extract（黄）について ..... 2

■準備するもの ..... 2

機器および器具類 ..... 2

試薬類 ..... 2

■ご使用にあたって ..... 3

■フローチャート ..... 3

**プロトコル** ..... 4

■*In vitro* タンパク質合成用の DNA テンプレートの調製 ..... 4

pTD1 Vector ..... 4

目的遺伝子の挿入位置について ..... 5

発現プラスミドの構築 ..... 6

■mRNA の調製 ..... 7

DNA テンプレートの直鎖化 ..... 7

mRNA の合成 ..... 8

mRNA の精製 ..... 8

mRNA 濃度測定 ..... 10

■タンパク質合成反応 ..... 11

標準反応プロトコル ..... 11

標識反応プロトコル ..... 13

RI 標識したタンパク質の検出 ..... 14

蛍光標識したタンパク質の検出 ..... 14

β－ガラクトシダーゼコントロール反応 ..... 14

β－ガラクトシダーゼの検出 ..... 15

**付録** ..... 17

■トラブルシューティング ..... 17

■参考文献 ..... 19

■MSDS の請求について ..... 19

■お問い合わせ窓口 ..... 19

# 製品内容



## ■概要

Transdirect *insect cell* は、昆虫培養細胞抽出液を用いた無細胞タンパク質合成試薬キットです。以下の特徴があります。

- あらかじめ調製した mRNA より、生細胞を用いることなく翻訳反応を行うことができます。
- バキュロウイルスを用いた組み換えタンパク質生産にも広く利用されている Sf21 昆虫細胞（*Spodoptera frugiperda* 卵巣細胞由来）の抽出液を使用しています。
- タンパク質合成能を高めるために、抽出方法を工夫し、反応液組成を最適化しています（特許出願中）。
- 昆虫培養細胞抽出液を用いた無細胞タンパク質合成に適する翻訳促進配列（*Malacosma neustria* nucleopolyhedrovirus 由来ポリヘドリン遺伝子の 5' 非翻訳領域）を有する発現ベクターが付属しています（特許出願中）。

## ■構成

本製品 (P/N 292-30000-91) は、表 1 に示す各試薬と取扱説明書 ( 本書 : P/N 292-30011) で構成されています。

**表 1 : 試薬（50 μL 反応系で 40 回相当分）**

| フタ色 | ラベル（品名） | 容量 | 本数 | 保存条件 | 備考 |
|---|---|---|---|---|---|
| 黄 | Insect Cell Extract | 210 μL | 5 本 | −80 ℃ | 細胞抽出液 |
| 青 | Reaction Buffer | 630 μL | 1 本 | −80 ℃ | 緩衝液、19 種アミノ酸（−メチオニン）、エネルギー源等 |
| 赤 | 4 mM Methionine | 50 μL | 1 本 | −20 ℃以下 | メチオニン（アミノ酸） |
| 緑 | 0.5 μg/μL pTD1 Vector | 10 μL | 1 本 | −20 ℃以下 | 発現ベクター |
| 白 | 0.5 μg/μL Control DNA | 10 μL | 1 本 | −20 ℃以下 | β−ガラクトシダーゼ遺伝子を pTD1 に組込み直鎖化したコントロール DNA |

注記
- 本製品には転写用試薬が含まれていません。別途ご準備ください。
- Insect Cell Extract（黄）および Reaction Buffer（青）は、製品到着後、すみやかに −80 ℃で保存してください。保存状態により合成能が失われることがありますのでご注意ください。
- 4 mM Methionine（赤）、0.5 μg/μL pTD1 Vector（緑）、0.5 μg/μL Control DNA（白）は、−20 ℃以下（−80 ℃でも可）で保存してください。
- 本製品は、【$^{35}$S】Methionine による効率的な RI 標識のためにメチオニンを Reaction Buffer（青）中には含めず、別途添付としています。

## Insect Cell Extract（黄）について

(1) 異なる Lot No. の試薬を混合して使用しないでください。タンパク質合成能が低下する場合があります。
(2) Lot 間でタンパク質合成能が異なる場合があります。
(3) Insect Cell Extract は $CO_2$ により劣化するおそれがあります。製品開封後は、$CO_2$ への極端な暴露はお避けください。

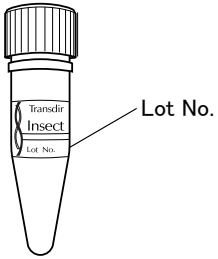



**図 1：Lot No.**

### ◆ 凍結融解

Insect Cell Extract（黄）の凍結と融解の繰り返しは、8 回以内としてください。融解は必ず氷上で行ってください。融解後はすぐに使用し、使用後はすみやかに −80 ℃で保存してください。

# ■準備するもの

## 機器および器具類

- 恒温槽（25 ℃および 37 ℃に調節可能なもの）
- 分光光度計
- ピペッター
- 滅菌済みのチップ、チューブ
- ディスポーザブル手袋
- ディスポーザブルゲルろ過カラム（必要に応じて）

## 試薬類

- 大量 mRNA 合成キット（T7）
- 直鎖化に用いる制限酵素（*Hind* Ⅲ、*Not* Ⅰなど）
- 滅菌蒸留水
- TE
- 3M 酢酸カリウム (pH5.5)
- TE 飽和フェノール

- クロロホルム

- エタノール

- 70% エタノール

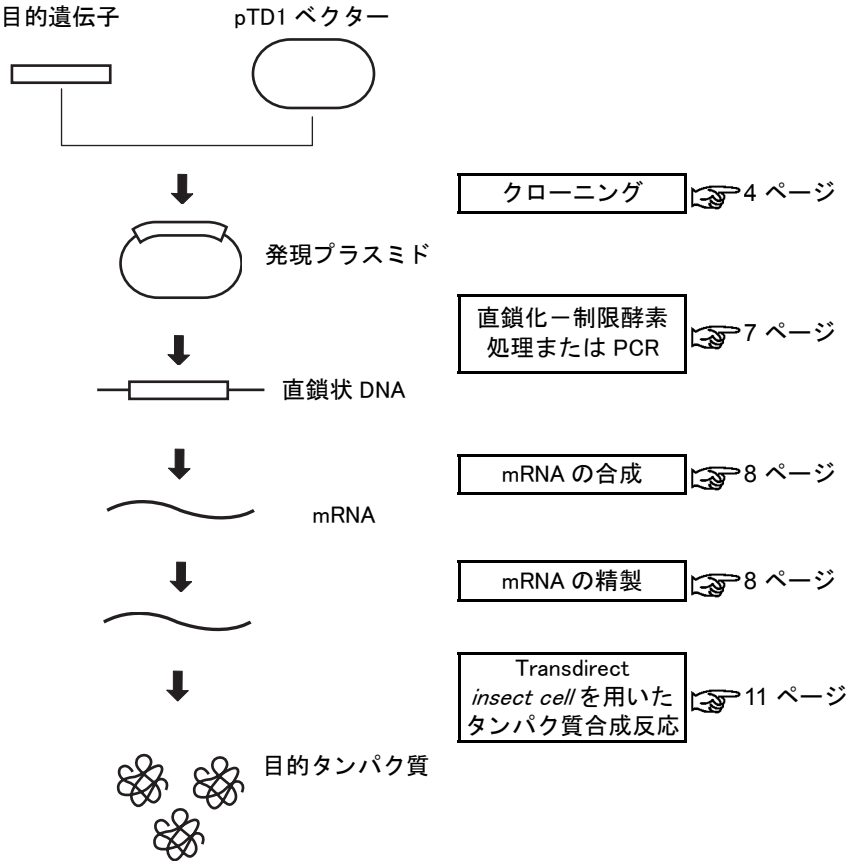
## ■ご使用にあたって

ご使用にあたって、以下の点についてご留意ください。

(1) タンパク質の種類によっては合成できない場合があります。
(2) 本製品のみでは、N- グリコシル化などの小胞体膜を介した翻訳後修飾は起こりません。上記翻訳後修飾の解析には市販のイヌすい臓ミクロソーム膜を添加してください。(推奨品 : Promega 社 Code No.Y4041)



## ■フローチャート



# プロトコル

## ■ *In vitro* タンパク質合成用の DNA テンプレートの調製

### pTD1 Vector

pTD1 Vector は、本製品を用いたタンパク質合成を行うために至適化されたベクターです（図 2）。pTD1 Vector は mRNA 合成に必要な T7 プロモーター配列、タンパク質合成反応を促進するポリヘドリン 5' 非翻訳領域（ポリヘドリン 5'UTR)、マルチクローニングサイト（MCS）など、mRNA の合成からタンパク質合成に関わるすべての因子を含んでいます。
またアンピシリン耐性遺伝子を含んでいます。形質転換体を培養する際はアンピシリンが 50 ～ 100 μg/mL となるように培地に添加してください。

pTD1 Vector の全塩基配列は下記の DNA データバンクに登録しています。
DDBJ/GenBank®/EMBL Accession Number: AB194742

**注記** pTD1 Vector 以外のプラスミドからもタンパク質合成を行うことは可能ですが、タンパク質合成量が減少するおそれがあります。pTD1 Vector に目的遺伝子をクローニングすることを推奨します。また pTD1 ベクターには、翻訳促進配列であるポリヘドリン 5'UTR が挿入されているため、mRNA 合成時にキャップアナログを用いてキャップ構造を導入する必要はありません。

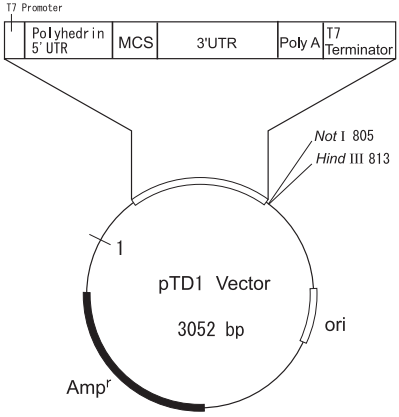



**図 2：pTD1 Vector マップ**

**表 2：pTD1 Vector における各領域の位置**

| | |
|---|---|
| T7 RNA polymerase promoter | 240–258 |
| Polyhedrin 5' untranslated region | 259–304 |
| Multiple cloning region | 305–343 |
| 3' Untranslated region | 359–731 |
| PolyA region | 736–757 |
| T7 transcription terminator | 758–805 |
| ColE1 ori | 835–1104 |
| β –lactamase(Amp$^r$)coding region | 1992–2852 |

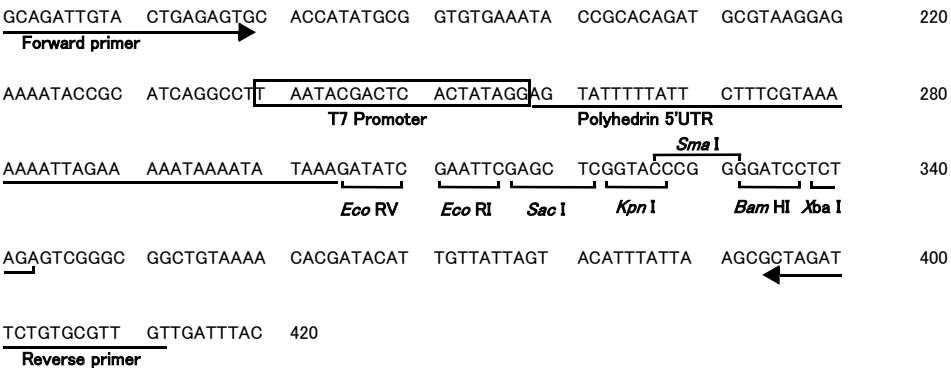



**図 3：pTD1 Vector のマルチクローニングサイト付近の塩基配列**

## 目的遺伝子の挿入位置について

pTD1 Vector に目的遺伝子をクローニングするときは、ポリヘドリン 5'UTR の下流に目的遺伝子の開始コドンを挿入してください。ポリヘドリン 5'UTR と開始コドンの距離が長くなると合成量が低下します。なるべく *Eco* RV サイトに挿入することを推奨します。ポリヘドリン 5'UTR の直下に開始コドンを挿入する場合は、PCR でポリヘドリン 5'UTR が 3' 末端となる DNA を調製し、そこに目的遺伝子の開始コドンを挿入してください。

**注記** PCR に関する特許は、Hoffman-La Roche 社が保有しております。本書の内容は、PCR に関する特許の使用許諾を示唆するものではありません。

## 発現プラスミドの構築

以下に、*Eco* RV サイトに目的遺伝子を挿入する場合の一般的な発現プラスミドの構築方法を示します。

**1** 目的遺伝子の ORF 部分 *1 を PCR*2 で増幅します。
このとき N 末端側プライマーは、開始コドンからの配列としてください。C 末端側プライマーは、平滑末端クローニングする場合を除き、挿入する制限酵素サイトの配列を 5’ 末端に導入してください。また制限酵素の種類によっては、末端に付加配列がなければ切断できない場合があります。制限酵素による効率的な切断を行うため、C 末端側プライマーの 5’ 末端に 2 塩基付加配列を導入することを推奨します。付加配列および制限酵素サイトの後に終止コドン、またはそれよりも下流からはじまる配列としてください。

注記 *1 真核生物のゲノムからの PCR は、イントロンを含む場合が考えられますので、cDNA から PCR を行ってください。

*2 PCR によるエラーを防ぐために Fidelity の高い酵素をお選びください。また、開始コドンを平滑末端クローニングするため、Terminal transferase 活性の少ない PCR 用酵素の使用を推奨します ( 例えば東洋紡績㈱ KODplus (Code No. KOD-201) など )。

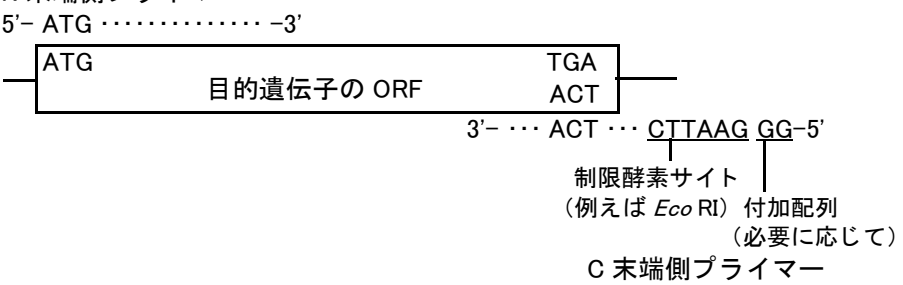



**図 4：プライマーの設計方法**

**2** PCR 産物をリン酸化します。

**3** PCR産物に導入した制限酵素サイトと同じ制限酵素でPCR産物を消化します。

**4** pTD1 Vector を挿入サイトである *Eco* RV と目的遺伝子に導入した制限酵素と同じ突出末端をもつ制限酵素で消化します。

**5** これらを用いて、目的遺伝子を pTD1 Vector に挿入します。

### ◆ シークエンスによりインサートを確認する場合

注記 以下の配列プライマーの使用を推奨します。
（アニーリング温度：50 ℃）
- フォワードプライマー（N 末端側）：
  5'-GCAGATTGTACTGAGAGTG-3' (161-179)
- リバースプライマー（C 末端側）：
  5'-ACAACGCACAGAATCTAGC-3' (412-394)

## ■ mRNA の調製

### DNA テンプレートの直鎖化

注記
- DNA テンプレートは、ターミネーター配列より下流の制限酵素（例えば *Hind* Ⅲ, *Not* Ⅰ）を用いて直鎖化してください。制限酵素で直鎖化した後は、RNase のコンタミネーションを防ぐためにフェノール / クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行ってください。
- PCR により直鎖状 DNA テンプレートを調製することもできます。この場合もフェノール / クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行ってください。以下の配列プライマーの使用を推奨します。（アニーリング温度：50 ℃）
  1) フォワードプライマー（N 末端側）：
     5'-GCAGATTGTACTGAGAGTG-3' (161-179)
  2) M13 系のリバースプライマー（C 末端側）：
     5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3' (845-827)

**表 3：pTD1Vector の直鎖化に適する制限酵素**

| 制限酵素 | 切断位置 |
|---|---|
| *Cfr* 10I | 2145 |
| *Eco* 52I | 806 |
| *Eco* T14I | 769 |
| *Hind* III | 813 |

| 制限酵素 | 切断位置 |
|---|---|
| *Nde* I | 183 |
| *Not* I | 805 |
| *Pvu* II | 994 |
| *Sca* I | 2543 |
| *Stu* I | 234 |

## mRNA の合成

**準備するもの**

・ 恒温槽（37 ℃に保温可能なもの）

注記
・ 以下のキットで調製した mRNA を用いて、タンパク質が合成できることを確認しています。mRNA は各社の取扱説明書に従って合成してください。
・ すべての操作は手袋を着用してください。

**表 4：大量 mRNA 合成キット**（品名のアルファベット順に記載）

| 品名 | メーカー | Code No. |
|---|---|---|
| AmpliScribe™ T7-*Flash* ™ Transcription Kit | Epicentre 社 | ASF3257 |
| AmpliScribe™ T7 Transcription Kit | Epicentre 社 | AS3107 |
| CUGA® 7 *in vitro* Transcription Kit | ㈱ニッポンジーンテク | 304-14641 |
| MEGA script® T7 High Yield Transcription Kit | Ambion 社 | 1334 |
| RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7 | Promega 社 | P1300 |
| RNAMaxx™ High Yield Transcription Kit | Stratagene 社 | 200339 |
| ScriptMAX™ Thermo T7 Transcription Kit | 東洋紡績㈱ | TSK101 |
| T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System | Promega 社 | P1320 |

## mRNA の精製

mRNA の精製方法は下記の 2 つがあります。再現性を高め安定した反応を必要とする合成には、塩と未反応 NTPs をゲルろ過により除去する A の方法を推奨します。
簡便に精製する方法として B の方法があります。この方法では未反応 NTPs が完全に除去されないため、見かけ上 mRNA 濃度が上昇します。最大の合成量を得るためには、最適な mRNA 添加量を検討することを推奨します。

| | |
|---|---|
| A | ゲルろ過カラムとエタノール沈殿を用いた精製法（☞ 9 ページ） |
| B | エタノール沈殿による精製法（☞ 10 ページ） |

### ◆ ゲルろ過カラムとエタノール沈殿を用いた精製法

**準備するもの**

- プレパックディスポーザブルゲルろ過カラム *1
- 3M 酢酸カリウム (pH 5.5)*2
- エタノール
- 70% エタノール
- 滅菌蒸留水（120 ℃で 20 分間オートクレーブ処理した蒸留水）

注記 *1 Amersham Biosciences 社 NICK™ Columns (Code No. 17-0855-01) を推奨します。

*2 エタノール沈殿に用いる塩は、酢酸カリウムを使用してください。それ以外の塩を使用するとタンパク質合成量が低下する場合があります。



**操作手順**

NICK™ Columns のプロトコルに従った場合の mRNA 精製方法について説明します。詳細は、Amersham Biosciences 社の取扱説明書を参照してください。

注記 すべての操作は手袋を着用してください。

**1** カラムの上フタを外し、溶液を捨てます。

**2** 3 mL の滅菌蒸留水でリンスをして、再度滅菌蒸留水を捨てます。

**3** カラム先端のキャップを外し、スタンドに立てます。

**4** ゲルを平衡化するため 3 mL の滅菌蒸留水を加え、完全に流しきります。

**5** mRNA 溶液をゲル上端にのせ（最大 100 μL まで）、完全に流しきります。

**6** 400 μL の滅菌蒸留水を加え、完全に流しきります。

**7** mRNA 溶液を受けるために、1.5 mL 容チューブをカラムの下に配置します。

**8** 400 μL の滅菌蒸留水を加え、mRNA 溶液を回収します（約 400 μL 回収できます）。

**9** 回収したmRNA溶液に40 μLの酢酸カリウムと950 μLのエタノールを加え、よく混合し 15,000 rpm、4 ℃で 20 分間遠心します。

**10** 上清を捨て 70 %エタノールでリンスを行い、mRNA の合成スケールに応じて 20 ～ 100 μL の滅菌蒸留水に溶解します。

注記　mRNA 濃度は 2 μg/μL 以上に調整ください。

◆ **エタノール沈殿による精製法**

**操作手順**

**1** mRNA 合成溶液を 400 μL になるように滅菌蒸留水で調整します。

**2** ″ゲルろ過カラムとエタノール沈殿を用いた精製法″（☞ 9 ページ）の手順 9 ～ 10 に従って、精製してください。

注記　このとき、未反応の NTPs により溶解しにくくなるため、リンス後は完全にドライアップせずに、滅菌蒸留水で溶解してください。

## mRNA 濃度測定

精製後、mRNA 溶液の吸光度を測定し濃度を決定します。mRNA 溶液を TE で希釈（100 ～ 400 倍）し、石英セルを用いて吸光度を測定してください。また測定時のブランクには TE を用いてください。

mRNA 濃度（μg/μL）= $A_{260}$ 値 × 0.04 × 希釈倍率

# ■ タンパク質合成反応

本製品は高いタンパク質合成能を得るために、反応液組成を最適化しています。また RI 標識および蛍光標識実験にも対応しています。

**準備するもの**

- 滅菌蒸留水（121 ℃で 20 分オートクレーブ処理した蒸留水）
- 恒温槽（25 ℃に保温可能なもの）
- 精製した mRNA

RI 標識実験を行う場合

- 【$^{35}$S】Methionine

蛍光標識実験を行う場合

- Promega 社 FluoroTect™ Green$_{Lys}$ in vitro Translation Labeling System (Code No. L5001)



## 標準反応プロトコル

下記は 50 μL スケールでの反応液組成です。用途に応じてスケールアップ・スケールダウンが可能です。

**表 5：50 μL スケールでの反応液組成**

| | |
|---|---|
| mRNA | 16 μg |
| Reaction Buffer（青） | 15 μL |
| Insect Cell Extract（黄） | 25 μL |
| 4 mM Methionine（赤） | 1 μL |
| 滅菌蒸留水 | 50 μL に調整 |

## ◆ 操作手順

注記　すべての操作は手袋を着用し、氷上または 4 ℃で行ってください。

**1** 必要な本数の Insect Cell Extract（黄）を −80 ℃から取り出して、氷上で融解します。

注記
- 30 分程度で融解します。融解後はすぐに使用し、使用後はすみやかに −80 ℃で保存してください。
- Reaction Buffer（青）と 4 mM Methionine（赤）は室温で融解可能です。融解後は、氷上に置いてください。使用後はすみやかに所定の温度で保存してください。

**2** 新しく用意したチューブに各成分を混合していきます。

**3** 最後に mRNA を添加し、軽くタッピングしてからスピンダウンします。合成反応が開始します。

**4** 25 ℃に調整した恒温槽にて、反応チューブを 5 時間インキュベートします。

**5** 合成反応が終了したらすみやかに氷上に移し、目的の研究にご使用ください。

## 標識反応プロトコル

【$^{35}$S】Methionine および Promega 社 FluoroTect™ Green$_{Lys}$ in vitro Translation Labeling System(Code No. L5001) を用いた標識方法を示します。
下記は 50 μL スケールでの反応液組成です。用途に応じてスケールアップ・スケールダウンが可能です。

**注記** RI 標識に【$^{3}$H】Leucine を用いることも可能です。その場合は、4 mM Methionine を標準反応と同様に添加して反応し、検出の際に露光時間を長くしてください。

**表 6：50 μL スケールでの反応液組成（標識反応プロトコル）**

| 標識方法 | 【$^{35}$S】Met 標識 | FluoroTect™ 標識 |
|---|---|---|
| mRNA | 16 μg | 16 μg |
| Reaction Buffer（青） | 15 μL | 15 μL |
| Insect Cell Extract（黄） | 25 μL | 25 μL |
| 【$^{35}$S】Methionine（1200 Ci/mmoL） 10 mCi/mL | 1 μL | ― |
| 4 mM Methionine（赤） | ― | 1 μL |
| FluoroTect™ Green$_{Lys}$tRNA | ― | 1 μL |
| 滅菌蒸留水 | 50 μL に調整 | |

**注意** RI 標識実験は、専用の RI 実験施設内で行う必要があります。RI を取扱う場合には、国や自治体、所属する施設などの定める法律、省令および規則に従ってください。

### ◆ 操作手順

標準反応プロトコル（☞ 12 ページ）の手順 1 ～ 5 に従って合成反応を行ってください。

## RI 標識したタンパク質の検出

RI 標識したタンパク質は、反応液の一部を SDS-PAGE に供与した後、オートラジオグラフィを行うことによりバンドとして検出することが可能です。

**1** SDS-PAGE 後のゲルを通常の方法で CBB 染色します。

**2** CBB 染色の脱色液にて脱色した後、ゲルを乾燥させます。

**3** 乾燥したゲルを用いて、オートラジオグラフィを行います。

注記
- 露光は X 線フィルムの場合、6 時間～ 1 日程度を目安にしてください。
- より高い感度を得るためには、増感剤（例えば Amersham Biosciences 社 Amplify Fluorographic Reagents(Code No. NAMP100) など）の使用と -80 ℃での露光によるフルオログラフィを行ってください。

## 蛍光標識したタンパク質の検出

Promega 社 FluoroTect™ $Green_{Lys}$ in vitro Translation Labeling System(Code No. L5001) を用いて蛍光標識したタンパク質は、反応液の一部を SDS-PAGE に供与した後、蛍光イメージアナライザーによりバンドとして検出することが可能です。

## β－ガラクトシダーゼコントロール反応

添付の 0.5 μg/μL Control DNA（白）は β－ガラクトシダーゼコントロール反応を行うための鋳型 DNA です。すでに直鎖化しています。

**1** 0.5 μg/μL Control DNA（白）を用い、″mRNA の調製″（☞ 7 ページ）に従って、β－ガラクトシダーゼ mRNA を調製します。

**2** β－ガラクトシダーゼ mRNA を用い、″標準反応プロトコル″（☞ 12 ページ）に従って、β－ガラクトシダーゼを合成します。

## β－ガラクトシダーゼの検出

コントロールタンパク質である β－ガラクトシダーゼの合成確認は、定量的方法と定性的方法があります。

### ◆ 定量的方法

**準備するもの**

- Promega 社の β－Galactosidase Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer（Code No. E2000）
- 分光光度計（㈱島津製作所　Biospec-mini など）

**操作手順**

以下に β－ガラクトシダーゼの定量的方法について示します。標準曲線の作成と活性値の算出についての詳細は Promega 社の取扱説明書を参照してください。

**1** 10 μL の合成反応液に 1 × Reporter Lysis Buffer を 490 μL 加え、50 倍希釈します。

**2** 50 倍希釈液を 10 μL とり、1 × Reporter Lysis Buffer を 140 μL、Assay 2 × Buffer を 150 μL 加え、37 ℃で 30 分間インキュベートします。

**3** 30 分後、ただちに 1M Sodium Carbonate を 500 μL 加えて、反応を停止させます。

**4** 分光光度計を用い、420 nm の吸光度を測定します。その値に希釈倍率の 50 を掛けて、標準曲線より得られた数値より β－ガラクトシダーゼの活性（U/mL）を算出します。

注記　β－ガラクトシダーゼコントロール反応を行った場合、10 U/mL の β－ガラクトシダーゼが合成可能です。

## ◆ 定性的方法

**準備するもの**

・ プロトコルに従ってタンパク質合成させた反応溶液

・ X-Gal 溶液（20 mg/mL：ジメチルホルムアミド

）

| | |
|---|---|
| 反応液 | 3 μL |
| X-Gal 溶液 | 1 μL |
| 滅菌蒸留水 | 16 μL |
| Total | 20 μL |

**操作手順**

**1** 37 ℃で、20 分間インキュベートします。

**2** 正常に合成された場合、青色に呈色します。

・ mRNA 未添加の反応液では呈色はみられません。

# 付録

## ■トラブルシューティング

| トラブル | 原因 | 対策 |
|---|---|---|
| プラスミドの回収量が少ない | 菌株が不適切である | プラスミド調製用の大腸菌は、DH5α™ (Invitrogen Code No.18258-012) を推奨します。また LB 培地を使用して培養することを推奨します。 |
| mRNA の合成量が少ない | 鋳型 DNA に塩などの夾雑物が混入している | フェノール／クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、最後の 70 %エタノールによる洗浄を確実に行ってください。(☞ 7 ページ) |
| | mRNA が分解されている | フェノール／クロロホルム抽出などで鋳型 DNA 溶液中の RNase を完全に不活化してください。 |
| コントロールタンパク質の合成量が少ない | キットの保存状態が不適当である | Insect Cell Extract（黄）および Reaction Buffer（青）は -80 ℃で保存してください。<br>4 mM Methionine（赤）、50 μg/μL pTD1 Vector（緑）および 0.5 μg/μL Control DNA（白）は、-20 ℃以下で保存してください。(☞ 1 ページ) |
| | mRNA が分解されている | フェノール／クロロホルム抽出などで mRNA 溶液中の RNase を完全に不活化してください。 |
| | | RNase inhibitor（ヒト胎盤由来）(推奨品 : タカラバイオ㈱ Code No.2310A、Promega 社 Code No.N2611) を 50 μL の系に対し、5 units 添加してください。合成量が改善される場合があります。 |
| | mRNA 溶液中にマグネシウムなどの塩が混入している | 反応液中の塩濃度は最適化されています。mRNA 溶液からの塩の混入によりタンパク質合成量が低下する場合があります。エタノール沈殿により塩を除去してください。 |
| | mRNA 溶液中にエタノールが混入している | エタノールの混入によりタンパク質合成量が低下する場合があります。mRNA 調整の際、できるだけエタノールの混入を避けてください。 |

| トラブル | 原因 | 対策 |
|---|---|---|
| コントロールタンパク質の合成量が少ない | mRNA 濃度が不適切である | エタノール沈殿による精製法では未反応 NTPs が完全に除去されないため、見かけ上 mRNA 濃度が上昇します。最適な mRNA の添加量を検討してください。(☞ 8 ページ) |
| | 凍結 / 融解の回数が多い | 凍結融解の繰り返しは、8 回以内としてください。また融解は必ず氷上で行ってください。融解後はすぐに使用し、使用後はすみやかに −80 ℃で保存してください。(☞ 2 ページ) |
| コントロールタンパク質は十分量合成されるが、目的タンパク質が合成されない、あるいは合成量が少ない | クローニング位置が不適当である | ベクターに目的遺伝子を挿入する場合、cDNA の ORF の開始コドンとエンハンサー配列からの距離をなるべく短くしてください（*Eco* RV サイトへの挿入を推奨します）。(☞ 5 ページ) |
| | ベクターが不適当である | 添付のベクター（0.5 μg/μL pTD1 Vector（緑））をお使いください。 |
| | 直鎖化に用いる制限酵素が不適切である | 7 ページの表 3 記載で、かつ作製プラスミドのインサートを切断しない制限酵素を使用してください。 |
| | 遺伝子中の塩基配列中に変異が入っている | シークエンスによりインサートの配列を確認してください。 |
| | 開始コドンが欠失している | シークエンスによりインサートの配列を確認してください。 |
| 活性が検出できない | タンパク質が正常にフォールディングされていない | フォールディングに特別なシャペロンが関与する場合は、正常なフォールディングが起きない可能性があります。また膜タンパク質など、疎水性の高いタンパク質の場合は凝集するおそれがあります。 |
| | ジスルフィド結合が形成されていない | タンパク質合成反応は還元条件下で行うため、ジスルフィド結合が活性に必須なタンパク質の場合、活性の低下または欠失がみられることがあります。 |
| タンパク質の精製ができない | 塩が影響している | タンパク質合成試薬は高濃度の塩が含まれるため、イオン交換カラムでの精製のときは脱塩操作が必要になります。 |
| RI 検出時にバックグランドが高い | 露光時間が長い | 露光時間が長いと目的以外の非特異的なバンドが検出されることがあります。露光時間を調整してください。 |
| | RI 添加量が不適当である | RI 添加量が多いと目的以外の非特異的なバンドが検出されることがあります。また添加量が少ないと露光に時間がかかります。添加量を調整してください。 |

## ■参考文献

伊東昌章
「昆虫由来抽出液を用いた無細胞タンパク質合成法の確立—実験目的に応じた様々な特性をもつ抽出液を求めて—」
化学と生物 , 2004, 42, 639-641

四方正光ら
「昆虫由来新規無細胞タンパク質合成試薬キットの開発」
生物工学会誌 , 2005, 83, 390-391

Ezure, T. *et al.*
Cell-free protein synthesis system prepared from insect cells by freeze-thawing
Biotechnol. Prog., 2006, 22, 1570-1577

Suzuki, T. *et al.*
Performance of expression vector, pTD1, for insect cell-free translation system
J. Biosci. Bioeng., 2006, 102, 69-71

Suzuki, T. *et al.*
N-terminal protein modifications in an insect cell-free protein synthesis system and their identification by mass spectrometry
Proteomics, 2006, 6, 4486-4495

Suzuki, T. *et al.*
Preparation of N-acylated proteins modified with fatty acids having a specific chain length using an insect cell-free protein synthesis system
Biosci. Biotechnol. Biochem., 2007, 71, 261-264



## ■MSDS の請求について

各試薬の MSDS について無料で資料を提供しております。下記お問い合わせ窓口に直接請求していただくか、Web サイトからダウンロードしてください。

## ■お問い合わせ窓口

株式会社　島津製作所
分析計測事業部　ライフサイエンスビジネスユニット
ライフサイエンス研究所

〒 604-8511　京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地
TEL　　: 075-823-1351
FAX　　: 075-823-1364
E-MAIL　: t-direct@shimadzu-biotech.jp
http://www.shimadzu-biotech.jp